

Esta invención se refiere a un método para la obtención por técnicas de ingeniería genética de plantas mejoradas en su capacidad de sintetizar, acumular y exudar ácidos orgánicos. Más específicamente se refiere a la generación de plantas transgénicas que tienen una capacidad mejorada de producir y excretar ácidos orgánicos, lo que les permite una mejor capacidad de absorción de nutrientes naturales del suelo o adicionados como fertilizantes a los suelos. Estas plantas tienen también una capacidad incrementada de tolerar la presencia en el suelo de ciertos compuestos tóxicos como es el aluminio. El método de transformación implica la introducción de genes que incrementa la capacidad de la planta para producir ácidos orgánicos y comprende los siguientes pasos: a) preparación de una molécula recombinante que comprenda la secuencia codificante para una enzima que produce ácidos orgánicos, funcionalmente ligados a una secuencia promotora activa en células vegetales y un terminador de la transcripción funcional en células vegetales, b) transformación de células vegetales con dicha construcción, c) la regeneración de plantas transgénicas a partir de las células transformadas.

Los ácidos orgánicos son moléculas muy versátiles que toman parte en diferentes procesos fisiológicos en todos los organismos vivos incluyendo las plantas. La biosíntesis de estos compuestos parece ser un fenómeno general que se encuentra conservado en los seres vivos, aunque en los animales se conoce a detalle su participación como precursores de vías metabólicas importantes como el ciclo de Krebs o el ciclo del glioxilato, su mecanismo de transporte y las enzimas con las que interactúan, en las plantas se tiene muy poca información al respecto.

Uno de los aspectos de esta invención, describe la construcción de una molécula de ADN recombinante que codifica la enzima citrato sintasa, funcionalmente ligada a una secuencia promotora de la transcripción funcional en plantas y una secuencia terminadora de la transcripción de plantas. La presente invención se refiere, pero no se limita, al uso del gen que codifica la citrato sintasa, ya que es posible también el uso de otros genes que codifican enzimas que sintetizan otros ácidos orgánicos como aquellas capaces de sintetizar el ácido málico y el ácido oxálico.

Para lograr la expresión de la secuencia codificante de la citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*, primero se procedió a construir el vector de expresión pB2. Para ello, la región del promotor (cab 80 de chicharo) del vector pGV151 1 delimitada por los sitios de restricción Hind III y Barn HI fue substituída por el fragmento Hind III - Barn HI del vector pBI 525, que contiene al doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, la región potenciadora del virus del mosaico de la alfalfa y el sitio de inicio de la traducción (como parte del sitio Nco I). La substitución de la región promotora del vector pGV151 1 por la de pBI 525 se verificó mediante análisis de restricción doble empleando los sitios Xba I y Hind III.

II. Construcción de la molécula recombinante p35SCSb

La región que codifica citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* a partir del residuo aminoacídico número 9, correspondiente a la secuencia de gltA delimitada por los sitios de restricción Bcl I y Barn HI, fue movilizada desde el vector pPKB al sitio Barn HI de pB2. La orientación del fragmento clonado se determinó por análisis del fragmento liberado por una doble restricción empleando las enzimas Xba I y Barn HI. Al clonar el fragmento Bcl I -Barn HI en la dirección correcta en pB2 la secuencia codificante de la citrato sintasa es modificada en sus 8 primeros residuos aminoacídicos respecto al péptido nativo, pues la secuencia en pPKB codifica Met-Ala-Asp-Lys-Lys-Ala-Glu-Leu, en tanto que en p35SCSb se codifica para Met-Ala-Ser-Arg-Pro; el resto de la secuencia polipeptídica que codifican ambas construcciones es la misma.

Para verificar el marco de lectura y la ausencia de modificaciones en la secuencia de la molécula recombinante p35SCSb, se determinó la secuencia de 600 pares de bases a partir del sitio Xba I de p35SCSb por el método de Sanger. La figura 1 ilustra los pasos seguidos para la obtención de p35SCSb a partir de sus diferentes componentes.

Obtención de plantas transgénicas que contiene en su genoma la molécula recombinante 35SCSb

El plásmido p35SCSb fue conjugado de *E. coli* a la cepa de *Agrobacterium* LB4404 (Hoekema A. et al. (1983), Nature 303, 179-180) usando el sistema de conjugación triparental que usa el plásmido asistente (helper plasmid) pRK2013. La molécula recombinante fue introducida en el genoma de Tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var. xanthi) usando el método de transformación de discos de hoja. Las plantas regeneradas, denominadas plantas CSb, fueron seleccionadas por su crecimiento en medio selectivo que contiene 50 microgramos de kanamicina por mililitro de medio de cultivo.